



УДК 578.085;57.086.83;576.524;577.15

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЛАЗМИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К АДГЕЗИОННЫМ БЕЛКАМ

© 2000 г. И. Г. Швыркова, Т. А. Муранова[#]*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142292, Пущино, Московская обл.*

Поступила в редакцию 20.01.99 г. Принята к печати 24.12.99 г.

Показано, что плазмин гидролизует белки, участвующие в клеточной адгезии (фибронектин, витронектин, ламинин), и не гидролизует белки, не относящиеся к категории адгезионных (альбумин, овалбумин, щелочная фосфатаза). В совокупности с полученными нами ранее результатами можно говорить о специфической антиадгезионной активности плазмينا. Это значительно расширяет рамки представлений о функциональной значимости этого белка и указывает на его непосредственное участие в процессах регуляции клеточной адгезии, ремоделирования межклеточного матрикса и, следовательно, в процессах миграции клеток.

Ключевые слова: плазмин; адгезия клеток; фибронектин; витронектин; ламинин.

ВВЕДЕНИЕ

Обязательным условием развития эмбрионов, поддержания архитектуры тканей, обеспечения воспалительного ответа и заживления ран являются адгезионные взаимодействия клеток между собой и с межклеточным матриксом. Функционирование клетки определяется организацией цитоскелета, также зависящей от взаимодействия клетки с матриксом [1–3]. Клеточная адгезия – это суммарный результат некоторого числа адгезионных взаимодействий, включающих разные семейства адгезионных молекул [4]. Механизм регуляции адгезионных взаимодействий клеток находится в начальной стадии изучения. Предполагается, что одним из способов регулирования адгезионных взаимодействий клеток с матриксом является изменение аффинности интегринов – трансмембранных белков, являющихся специфическими рецепторами адгезионных белков на клеточной поверхности. Другой путь регулирования осуществляется при помощи протеиназ через протеолиз адгезионных белков и компонентов межклеточного матрикса [5–9].

В последние годы получены данные, свидетельствующие об участии плазминовой системы в процессах ремоделирования межклеточного матрикса и в регулировании адгезионных взаимодействий клеток. Например, в ряде лабораторий показано, что плазмин активирует некоторые прометаллопротеиназы, являющиеся коллагеназами [8, 10]. В предыдущих работах мы представили прямые экспериментальные доказательства антиадгезионной активности самого плазмينا [11, 12]. Было показано, что добавление плазмينا (или плазминоге-

на) к культуре контактзависимых клеток в бессывороточной среде вызывает открепление клеток от субстрата. Этот эффект может быть объяснен протеолитической активностью плазмينا.

Настоящее исследование посвящено изучению специфичности плазмينا как антиадгезионной протеиназы и действия плазмينا на конкретные компоненты адгезионной системы – адгезионные белки: фибронектин, витронектин и ламинин, участвующие в формировании адгезионных “бляшек” и осуществляющие связь клетки с матриксом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидролиз белков плазмином проводили в условиях, приближенных к тем, при которых, как установлено нами ранее, происходит открепление клеток от субстрата при внесении плазмينا или плазминогена в бессывороточную среду культивирования [11, 12]. Плазмин получали активацией урокиназой плазминогена, который выделяли из сыворотки крови собаки аффинной хроматографией на лизин-сефарозе по методу [13] с небольшими модификациями. Чтобы исключить предположение о вкладе урокиназы в протеолиз изучаемых белков при гидролизе их плазмином (препарат плазмينا содержал урокиназу в следовых количествах) были проведены контрольные эксперименты по обработке белков урокиназой в течение длительного времени при таком же ее содержании в реакционной смеси, как при экспериментах с препаратами плазмينا, а также эксперименты с использованием препаратов плазмينا, полученных без урокиназы путем автолиза плазминогена собаки в течение 72 ч при 37°C [14].

Фибронектин – высокомолекулярный гликопротеин, присутствующий в межклеточном мат-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 925-23-42; факс: (27) 79-05-27; e-mail: muranova@fibkh.serpukhov.su).

рикс и в плазме крови в виде димера, образованного похожими, но не идентичными полипептидными цепями с молекулярной массой 210–220 кДа, имеющими доменную структуру. Фибронектин может специфически связываться с различными макромолекулами, являющимися структурными компонентами матрикса (коллаген, фибрин, фибриноген, гепарин, протеогликаны), а также с рецепторами клеточной поверхности [15]. Фибронектин, выделенный нами из плазмы крови барана аффинной хроматографией на желатин-сефарозе с последующей очисткой методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе [16, 17], при SDS-электрофорезе в ПААГ виден как дуплет полос близкой молекулярной массы и содержит ряд минорных белковых компонентов (рис. 1, дорожка б). После инкубации с плазмином (Е : S, 1 : 20, 10 ч, 37°C) образуется фрагмент с молекулярной массой около 200 кДа, что говорит о частичном протеолизе одной или обеих субъединиц (рис. 1, 3). При контрольной инкубации исходного препарата фибронектина в тех же условиях, но без плазмينا, не наблюдали изменений в составе препарата (рис. 1, 5). МакДонах и др. при обработке фибронектина плазмином человека наблюдали образование 4 фрагментов с молекулярной массой 170, 29, 23 и 6 кДа [18, 19], а Голд и сотр. – 5 фрагментов с молекулярной массой 200, 170, 100, 80 и 29 кДа [20]. При инкубации фибронектина с урокиназой в наших условиях (Е : S, 1 : 1000, 10 ч) гидролиз белка не происходил (рис. 1, 2), хотя в более жестких условиях (Е : S, 1 : 50, 17 ч) Голд и сотр. наблюдали расщепление фибронектина при обработке белка урокиназой [20].

Витронектин является адгезионным гликопротеином, который участвует в прикреплении клеток к субстрату, способствует их расплыванию, влияет на морфологию, рост, скорость пролиферации. Его концентрация в плазме крови колеблется от 200 до 400 мкг/мл. Этот белок входит в состав межклеточного матрикса эпителиальной, эндотелиальной и других тканей, в том числе обнаружен в атеросклеротических бляшках и карциноме. Молекула витронектина состоит из 2 субъединиц с молекулярной массой 78 и 65 кДа [21].

Витронектин выделяли из бычьей сыворотки методом аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе в условиях, описанных в работе [21]. Полученный препарат кроме основных субъединиц содержал минорный компонент с молекулярной массой 59–60 кДа. Инкубация с плазмином (Е : S, 1 : 20, 5 ч) приводит к полному исчезновению субъединицы 78 кДа и появлению полипептида с молекулярной массой около 61–63 кДа (рис. 2, б). В то же время в контрольных экспериментах без фермента витронектин не подвергался никаким изменениям (рис. 2, 5), как и после инкубации с плазминогеном (рис. 2, 7) или урокиназой (рис. 2, 8). Полученные результаты согла-

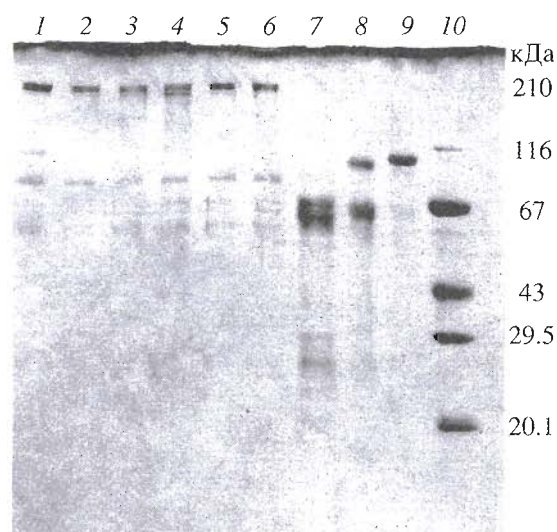


Рис. 1. SDS-электрофорез в ПААГ смесей после инкубации фибронектина с плазмином, полученным активацией плазминогена из сыворотки крови собаки урокиназой (3) или в результате автолиза плазминогена (4), с плазминогеном (1), с урокиназой (2) и после контрольной инкубации без ферментов (5). б – исходный препарат фибронектина; 7 и 8 – плазмин, полученный активацией плазминогена из сыворотки крови собаки урокиназой (дуплет полос с молекулярной массой около 67 кДа соответствует Glu- и Lys-формам тяжелой цепи плазмينا собаки) и в результате автолиза плазминогена соответственно; 9 – плазминоген; 10 – маркеры молекулярных масс, справа указаны их молекулярные массы.

суются с данными Кост и сотр. [22], которые наблюдали гидролиз витронектина плазмином.

Ламинин – один из основных компонентов базальных мембран многих тканей, локализованный в местах непосредственного примыкания к ним клеток, что указывает на его роль посредника при взаимодействии клеток с базальной мембраной. Белок состоит из трех субъединиц с молекулярной массой 400 (А-цепь), 210 (В1-цепь) и 200 кДа (В2- или γ-цепь). Содержание углеводов составляет 25% веса молекулы [23].

Ламинин инкубировали с плазмином при соотношении фермент : субстрат 1 : 5 (рис. 3), что приводило к полному гидролизу субъединиц до фрагментов с молекулярной массой между 20 и 200 кДа (рис. 3, 1, 2). В контрольных экспериментах в тех же условиях без фермента не наблюдали никаких изменений белкового состава (рис. 3, 3). Инкубация ламинина с урокиназой также не приводила к протеолизу белка.

Фибронектин, витронектин и ламинин, входя в состав межклеточного матрикса, являются адгезионными белками-коннекторами, через которые осуществляется один из механизмов адгезии клеток по схеме, представленной на рис. 4, и которые связаны, с одной стороны, с каркасными структурами межклеточного матрикса, с другой –

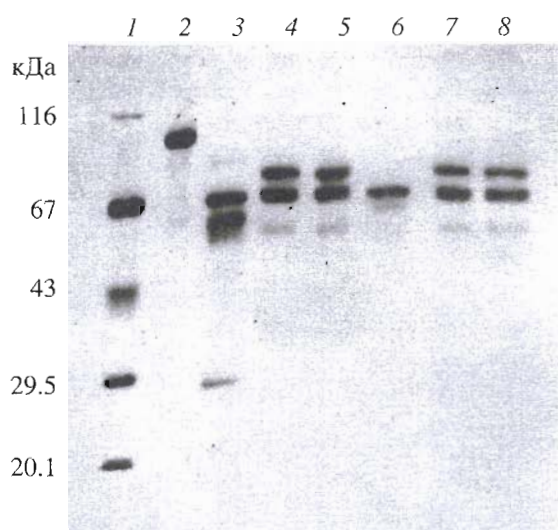


Рис. 2. SDS-электрофорез в ПААГ смесей после протеолиза витронектина (исходный препарат – 4) плазмином (6); после контрольной инкубации без ферментов (5); после инкубации с плазминогеном (7) и с урокиназой (8). 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – плазминоген; 3 – плазмин.

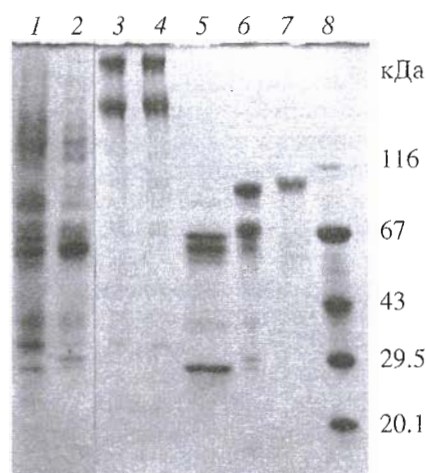


Рис. 3. SDS-электрофорез в ПААГ смесей после протеолиза ламинина (исходный препарат ламинина – 4) плазмином, полученным активацией плазминогена из сыворотки крови собаки урокиназой (1) или в результате автолиза плазминогена (2). 3 – ламинин после контрольной инкубации без ферментов; 5 и 6 – плазмин, полученный активацией плазминогена из сыворотки крови собаки урокиназой и в результате автолиза плазминогена, соответственно; 7 – плазминоген; 8 – маркеры молекулярных масс.

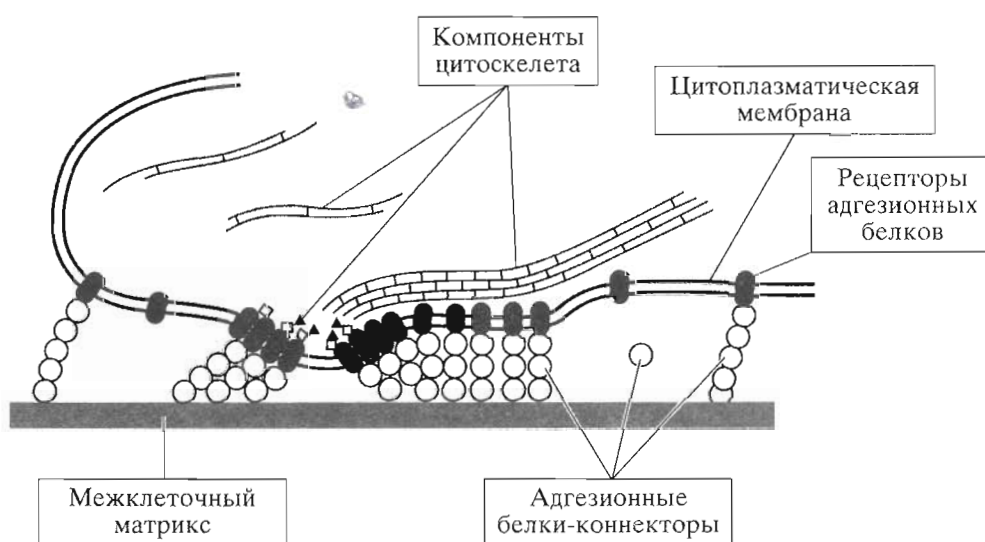


Рис. 4. Схема участков фокальной адгезии клеток [15].

с рецепторами на поверхности клеток. Гидролизуя белки-коннекторы, плазмин не действует на основной структурный компонент матрикса – коллаген, расщепляя только “ножки”, связывающие клетки с каркасом матрикса.

Обладает ли плазмин специфичностью именно по отношению к адгезионным белкам? Для проверки этого предположения проводили обработку плазмином ряда белков, не относящихся к категории адгезионных (альбумин, овальбумин, щелочная фосфатаза), в тех же условиях, что и

адгезионные белки, увеличив время гидролиза и нагрузку фермента. Ни в одном случае не наблюдали гидролиза исходных полипептидных цепей. Все белки оказались устойчивы к действию плазмина (иллюстрации не приведены).

Как известно, плазмин является сериновой протеиназой. Его избирательность по отношению к адгезионным белкам, очевидно, обусловлена наличием у последних сходных структурных элементов, обеспечивающих их специфическое связывание с плазмином. Исследования целого

ряда лабораторий подтверждают эту идею. Показано, что плазминоген, являющийся предшественником плазима, специфически связывается с такими адгезионными белками, как витронектин [24, 25] и тромбоспондин [25, 26], причем константа связывания плазминогена с витронектином в 100 раз выше, чем с фибрином [24, 27].

Принимая во внимание результаты ряда лабораторий, где наблюдали действие плазима на такие адгезионные белки, как тромбоспондин и фактор фон Виллебранда [28–32], можно утверждать, что плазмин, являясь необходимым компонентом антиадгезионного ферментного комплекса, участвующего в процессах миграции клеток и ремоделировании межклеточного матрикса, выполняет вполне конкретную роль, осуществляя гидролиз адгезионных белков-коннекторов, в то время как структурные компоненты матрикса разрушаются под действием других ферментов.

Полученные результаты в совокупности с опубликованными ранее данными [11, 12], позволяют говорить о специфической антиадгезионной активности плазима, что значительно расширяет рамки современных представлений о функциональной значимости этого белка и указывает на его непосредственное участие в процессах регуляции клеточной адгезии, ремоделирования межклеточного матрикса и, следовательно, в процессах миграции клеток. Ограниченный протеолиз плазмином адгезионных белков-коннекторов на участках фокальной адгезии, происходящий в результате повышенной секреции активаторов плазминогена опухолевыми клетками, может быть начальным событием процессов миграции раковых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазминоген выделяли из сыворотки крови собаки в условиях, описанных в работе [12]. Белковую фракцию, содержащую плазминоген, осаждали 50% сульфатом аммония в течение 30 мин при комнатной температуре, затем 16 ч при 4°C. Осадок растворяли в 0.01 М Na-фосфатном буфере (pH 8.5), содержащем 0.05 М NaCl, и диализовали против того же буфера при 4°C. Плазминоген отделяли от основной массы белков методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 0.01 М Na-фосфатном буфере (pH 8.5), содержащем 0.05 М NaCl, и далее очищали методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе [13]. После диализа против 0.05 М Na-глицинового буфера (pH 8.3) при 4°C белок лиофилизовали и хранили при –20°C. Лизин-сефарозу получали конъюгацией лизина (Serva, Германия) с BrCN-активированной сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) по методике, описанной в руководстве фирмы Pharmacia [33].

Плазмин получали из плазминогена путем инкубации с урокиназой (Sigma, США) в 0.01 М Na-фосфатном буфере (pH 7.6), содержащем

0.15 М NaCl–0.001 М EDTA, в течение 10 ч при 37°C при концентрации плазминогена 1 мг/мл и соотношении E : S, 1 : 200 [34].

Фибронектин выделяли из плазмы крови барана методом аффинной хроматографии на желатин-сефарозе в условиях, описанных в работе [16]. Желатин-сефарозу получали в результате ковалентного связывания желатина с BrCN-активированной сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) [35]. Далее фракцию, содержащую фибронектин, очищали при помощи ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 0.01 М Na-фосфатном буфере (pH 8.5) в градиенте концентрации NaCl (15–500 мМ) при комнатной температуре [17]. Белок диализовали против водного раствора 1 мМ N-этилморфолина (pH 8.0) и лиофилизовали.

Витронектин выделяли из бычьей сыворотки аффинной хроматографией на гепарин-сефарозе в условиях, описанных в работе [21]. Гепарин-сефарозу получали в результате ковалентного связывания гепарина с BrCN-активированной сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) [36]. Раствор белка диализовали против водного раствора 1 мМ N-этилморфолина (pH 8.0) и лиофилизовали.

В экспериментах также использованы ламинин и бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), овальбумин (Pharmacia, Швеция). Щелочная фосфатаза из *E. coli* была любезно предоставлена Л.М. Винокуровым (филиал ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Аналитические процедуры. Концентрацию белков в растворах определяли методом Брэдфорд [37]. Электрофорез белков проводили в 8–12% SDS-ПААГ в присутствии 2-меркаптоэтанола [38]. N-Концевые аминокислотные последовательности белков определяли методом автоматической деградации по Эдману на газофазном секвенаторе 470А (Applied Biosystems, США).

Протеолиз белков плазмином. Белки инкубировали с плазмином в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 150 мМ NaCl, при 37°C при концентрации белков 1 мг/мл. Фибронектин, витронектин, овальбумин, щелочную фосфатазу гидролизовали при соотношении фермент/субстрат 1 : 20 (по весу), альбумин – при соотношении 1 : 10, ламинин – 1 : 5. Время гидролиза фибронектина, альбумина, овальбумина, щелочной фосфатазы составляло 10 ч, ламинина и витронектина – 5 ч.

Инкубацию белков с плазмином проводили в тех же условиях, что и гидролиз плазмином.

Инкубацию белков с урокиназой осуществляли в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 10 ч при 37°C при соотношении фермент/субстрат 1 : 1000 (по весу).

В контрольных экспериментах проводили инкубацию белков без ферментов в условиях, аналогичных описанным для протеолиза плазмином.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТПР "Новейшие методы биоинженерии" (раздел "Белковая инженерия", грант № 03.0001Н-307).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ingber D.E. // *J. Cell Sci.* 1993. V. 104. P. 613–627.
2. Juliano R.L., Haskill S. // *J. Cell Biol.* 1993. V. 120. P. 577–585.
3. Sims J.R., Karp S., Ingber D.E. // *J. Cell Sci.* 1992. V. 103. P. 1215–1222.
4. Альбертс Б., Брэй Д., Льюис Д., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: Пер. с англ. М.: Мир, 1994. Т. 2. С. 522–529.
5. Mignatti P., Rifkin D.B. // *Physiol. Reviews.* 1993. V. 73. P. 161–195.
6. Moscatelli D., Rifkin D.B. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1988. V. 948. P. 67–85.
7. Eaton D.L., Scott R.W., Baker J.B. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 6241–6247.
8. Matrisian L.M. // *BioEssays.* 1992. V. 14. P. 455–463.
9. Werb Z. // *Cell.* 1997. V. 91. P. 439–442.
10. Wong A.P., Contez Sh.L., Baricos W.H. // *Am. J. Physiol.* 1992. V. 263. P. F1112–F1118.
11. Muranova T., Shvyrkova I., Arkhipov V., Rykunova A. // *Fibrinolysis and Proteolysis.* 1998. V. 12. P. 23–32.
12. Муранова Т.А., Швыркова И.Г., Рыкунова А.И. // *Биоорганическая химия.* 1999. Т. 26. С. 187–191.
13. Deutch D.G., Mertz E.T. // *Science.* 1970. V. 170. P. 1095–1096.
14. Alkjaersig N., Fletcher A.P., Sherry S. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 233. P. 81–85.
15. Dufour S., Duband J.-L., Thiery J.-P. // *Biol. Cell.* 1986. V. 58. P. 1–14.
16. Regnault V., Rivat C., Stolz J.F. // *J. Chrom.* 1988. V. 432. P. 93–102.
17. Skorstengaard K., Thogersen H.C., Vibe-Pedersen K., Petersen T.E., Magnusson S. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 128. P. 605–623.
18. McDonagh R.P., McDonagh J., Petersen T.E., Thogersen H.C., Skorstengaard K., Sottrup-Jensen L., Magnusson S. // *FEBS Lett.* 1981. V. 127. P. 174–178.
19. Thogersen H.C., Petersen T.E., Skorstengaard K., Vibe-Pedersen K., McDonagh R., McDonagh J., Magnusson S., Sottrup-Jensen L. // *Protides Biological Fluids.* Brussel, 1980. Abst. № 28.
20. Gold L.I., Schwimmer R., Quigley J.P. // *Biochem. J.* 1989. V. 262. P. 529–534.
21. Yatohgo T., Izumi M., Kashiwagi H., Hayashi M. // *Cell Str. Function.* 1988. V. 13. P. 281–292.
22. Kost Ch., Benner K., Stockmann A., Linder D., Preissner K.T. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 236. P. 682–688.
23. Luckenbill-Edds L. // *Brain Res. Reviews.* 1997. V. 23. P. 1–27.
24. Preissner K.T. // *Biophys. Biochem. Res. Comm.* 1990. V. 168. P. 966–971.
25. Knudsen B.S., Silverstein R.L., Leung L.L.K., Harpel P.C., Nachman R.L. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 10765–10771.
26. Silverstein R.L., Leung L.L.K., Harpel P.C., Nachman R.L. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 75. P. 2065–2073.
27. Salonen E.M., Saksela O., Vartio T., Nielson L.S., Zeuthen J. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12302–12307.
28. Lawler J.W., Slayter H.S. // *Thrombosis Research.* 1981. V. 22. P. 267–279.
29. Hamilton K.K., Fretto L.J., Grierson D.S., McKee P.A. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 76. P. 261–270.
30. Liotta L.A., Goldfarb R.H., Brundage R., Siegal G.P., Terranova V., Garbisa S. // *Cancer Res.* 1981. V. 41. P. 4629–4636.
31. Sane D.C., Moser T.L., Greenberg C.S. // *Thrombosis Haemostasis.* 1991. V. 66. P. 310–314.
32. Chain D., Kreizman T., Shapira H., Shaltid S. // *FEBS Lett.* 1991. V. 285. P. 251–256.
33. *Affinity Chromatography. Principles and Methods // Pharmacia. Fine Chemicals.* 1979. P. 10–15.
34. Walther P.J., Steinman H.M., Hill R.M., McKee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 1173–1181.
35. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 348–349.
36. Fujikawa K., Thompson A.R., Legaz M.E., Meyer R.G., Davie E.W. // *Biochemistry.* 1973. V. 12. P. 4938–4945.
37. Bradford M.M. // *Analyt. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
38. Laemmly U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

Proteolytic Specificity of Plasmin toward Adhesive Proteins

I. G. Shvyrkova and T. A. Muranova[#]

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

We showed that plasmin specifically hydrolyzes proteins participating in cell adhesion (fibronectin, vitronectin, and laminin) and does not affect nonadhesive proteins, such as albumin, ovalbumin, and alkaline phosphatase. These and some earlier results allow us to speak of the specific antiadhesive activity of plasmin, which significantly extends the concepts regarding the functional importance of this protein and indicates that it directly participates in the regulation of cell adhesion, the remodeling of the extracellular matrix, and, therefore, in cell migration.

Key words: plasmin, cell adhesion, fibronectin, vitronectin, laminin

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 925-2342; fax: +7 (27) 79-0527; e-mail: muranova@fibkh.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.